

# Desenvolvimento de metodologia LC-MS/MS para análise de ácidos dicarboxílicos provenientes da conversão de lignina

*Flávia Soares Vieira<sup>1</sup>, José Antônio de Aquino Ribeiro<sup>2</sup>, Clenilson Martins Rodrigues<sup>3</sup>*

## Resumo

A lignina é um polímero complexo gerado em grandes quantidades como coproduto pela indústria de papel e celulose. A conversão dessa macromolécula em produtos químicos de maior valor agregado tem sido objeto de estudos como forma de implementar o desenvolvimento sustentável para as indústrias baseadas em biomassa lignocelulósica. Dentre os compostos que podem ser obtidos na despolimerização e conversão da lignina, destacam-se os ácidos carboxílicos alifáticos, que possuem aplicações nas indústrias de biopolímeros, farmacêutica e de aditivos alimentares. Assim, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de estabelecer um método baseado em cromatografia líquida de ultraalta eficiência acoplada à espectrometria de massas (UHPLCMS) para detectar e quantificar ácido adípico, ácido oxálico e ácido succínico, provenientes da conversão (bio)catalítica de lignina. Foram avaliadas três colunas cromatográficas, sendo a melhor condição de análise obtida com a coluna HSS T3 (1,8  $\mu$ m; 2,1x 150 mm, Waters), empregando um sistema de eluição em modo gradiente e constituído de fase móvel A: água acidificada com ácido fórmico 0,1% e B: acetonitrila acidificada com ácido fórmico 0,1%. Todas as fases estacionárias avaliadas apresentaram condições satisfatórias para análise de ácido adípico e ácido succínico, mas apenas com a coluna HSS T3 foi obtida condição de detecção de ácido oxálico, ainda que com baixa sensibilidade. Esse estudo investigou metodologias capazes de analisar três ácidos dicarboxílicos por UHPLC-MS/MS, resultando em um protocolo que viabiliza a detecção simultânea e de forma seletiva dos compostos avaliados.

**Palavras-chave:** UHPLC-MS/MS, ácidos dicarboxílicos, lignina.

## Introdução

A biomassa lignocelulósica corresponde a uma abundante fonte de carbono renovável. É composta principalmente por celulose, hemicelulose e lignina, sendo a lignina o componente mais complexo. A indústria de papel e celulose gera anualmente grande quantidade de lignina, no entanto, a maior parte desta é queimada para produção de calor e energia. Por ser um polímero natural e abundante, a lignina possui grande potencial de uso como matéria-prima renovável. A partir da despolimerização

<sup>1</sup> Farmacêutica, mestre em Química, Universidade Federal de Goiás, sv.flavia@gmail.com,

<sup>2</sup> Farmacêutico, mestre em Ciências Farmacêuticas, analista da Embrapa Agroenergia, jose.ribeiro@embrapa.br,

<sup>3</sup> Químico, doutor em Química, pesquisador da Embrapa Agroenergia, clenilson.rodrigues@embrapa.br.

dessa macromolécula podem ser obtidos outros compostos, de menor tamanho e que possuem maior valor de mercado. Entretanto, por ter uma estrutura complexa e heterogênea, sua conversão em outros produtos é um desafio e tem sido objeto de estudos em diversos países (Mei et al., 2019; Ponnusamy et al., 2019).

Dentre os compostos relatados como produtos da conversão da lignina estão os ácidos carboxílicos, sendo obtidos principalmente os ácidos aromáticos a partir da oxidação dos monômeros de lignina. Ácidos carboxílicos alifáticos são produtos químicos importantes e de grande valor para diversos ramos industriais, tais como as indústrias de biopolímeros, farmacêutica e de aditivos alimentares, possuindo um mercado ainda maior do que o de ácidos carboxílicos aromáticos. Como atualmente a base de produção desses compostos tem sido os combustíveis fósseis, pesquisas têm buscado tecnologias para converter lignina em ácidos alifáticos como uma estratégia renovável de obtenção dessa classe química (Mei et al., 2019; Haldar; Purkait, 2020).

Dentre as diversas abordagens analíticas utilizadas para análise de ácidos orgânicos, a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas tem sido utilizada na identificação e quantificação de analitos em matrizes complexas (Huang et al., 2012; Xiao et al., 2012). O emprego dessa técnica, no modo de monitoramento de reação múltipla (MRM do inglês, Multiple Reaction Monitoring), permite a detecção de íons específicos em amostras complexas, proporcionando alta seletividade às análises (Putri; Fukusaki, 2014).

Diante disso, o objetivo desse trabalho foi definir um método para quantificação de ácido adípico, ácido oxálico e ácido succínico, provenientes da conversão da lignina, por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (UHPLC-MS/MS). Para isso, foram avaliadas três diferentes fases estacionárias: as colunas SeQuant Zic-HILIC, BEH Amida e HSS T3.

## Material e Métodos

### Reagentes

Foram utilizados acetonitrila grau LC-MS (Biograde), acetato de amônio (LiChropur) e metanol grau LC-MS (Lichrosolv). Hidróxido de amônio, formiato de amônio, ácido fórmico, ácido adípico, ácido oxálico e ácido succínico foram obtidos da empresa Sigma-Aldrich. Água ultrapura foi obtida utilizando um sistema de purificação Milli-Q (Millipore).

### Instrumentação

Os experimentos de cromatografia líquida de ultra-alta eficiência, acoplada a espectrometria de massas (UHPLC-MS), foram realizados em espectrômetro de massas (modelo Acquity Xevo TQD, Waters) equipado com fonte de ionização por *electrospray* (ESI) e analisador de massas do tipo triplo quadrupolo (QqQ, TQD, Waters). Os dados espectrais foram adquiridos e processados pelo software MassLynx 4.1 (Waters). O MS foi operado em modo de ionização negativa, ESI(-)-MS, usando monitoramento de reações múltiplas (MRM). Os parâmetros instrumentais (voltagem do capilar e energia do cone) foram otimizados a partir da técnica de infusão direta por espectrometria

de massas (DIMS – do inglês, *Direct Infusion Mass Spectrometry*) de modo a obter os sinais da razão massa/carga ( $m/z$ ) mais intensos para cada analito analisado. Utilizou-se a espectrometria de massas tandem (MS/MS) para seleção das energias de colisão utilizadas na fragmentação do íon precursor e obtenção dos perfis de fragmentação.

As colunas cromatográficas avaliadas foram: SeQuant Zic-HILIC (3,5  $\mu\text{m}$ ; 100 x 2,1 mm), HILIC BEH Amida (1,7  $\mu\text{m}$ ; 2,1 x 150 mm, Waters) e HSS T3 (1,8  $\mu\text{m}$ ; 2,1 x 150 mm, Waters).

## Resultados e Discussão

Os compostos foram detectados no modo negativo (ESI(-)), que promove a identificação das massas na forma desprotonada. Para configurar o modo MRM, ajustou-se as condições de energia do cone e de colisão de modo a obter os sinais da razão massa/carga ( $m/z$ ) mais intensos para cada analito analisado. A Tabela 1 mostra o resultado final com as melhores energias do cone e de colisão para cada composto, o íon precursor e íon fragmento utilizados para o método MRM.

**Tabela 1.** Condições experimentais otimizadas para experimentos de MRM de análise dos ácidos orgânicos.

Composto	Íon Precursor ( $m/z$ )	Íon Fragmento ( $m/z$ )	Energia do cone (V)	Energia de colisão (V)
Ácido adípico	144,95	100,94	25	14
Ácido oxálico	88,85	60,83	20	7
Ácido succínico	117,00	73,00	22	10

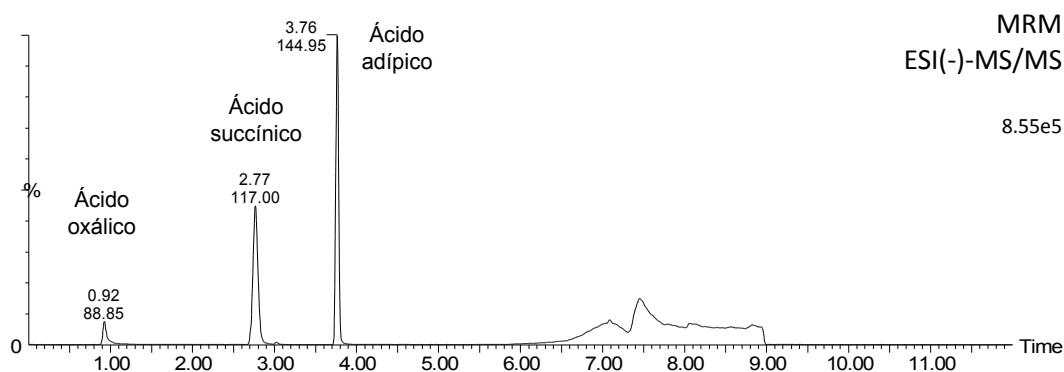
O estudo avaliou três colunas cromatográficas. Para as colunas SeQuant e BEH Amida, empregou-se a fase móvel A: ACN/ $\text{H}_2\text{O}$  (90/10) com tampão acetato de amônio e B: ACN/ $\text{H}_2\text{O}$  (40/60) com tampão acetato de amônio. Os parâmetros avaliados foram: concentração do tampão (10, 20 e 25 mM), gradiente de eluição, temperatura da coluna (25, 35 e 60°C), e uso de tampão formiato de amônio no lugar de acetato. Com a coluna BEH Amida, foram avaliadas fase móvel com pH neutro, fase móvel alcalina com adição de 0,1% hidróxido amônio a ambas as fases, e fase móvel ácida com adição de 0,1% de ácido fórmico. Nas três condições, a temperatura da coluna foi mantida em 40°C.

Foram obtidas boas condições de separação e detecção para ácido adípico e ácido succínico tanto com a coluna SeQuant quanto com a BEH Amida, no entanto, o ácido oxálico apresentou problemas de assimetria de pico e detecção. Utilizando a coluna HSS T3 foi possível detectar todos os três ácidos. A melhor condição foi obtida utilizando fase móvel acidificada pela adição 0,1% de ácido fórmico na fase aquosa ( $\text{H}_2\text{O}$ ) e na fase orgânica (Acetonitrila), com a coluna HSS T3. Essa coluna possui fase estacionária apolar (C18) e, portanto, necessita que o equilíbrio da forma não dissociada dos ácidos seja favorecido para que haja maior interação com a coluna. A temperatura da coluna foi mantida em 40°C. A Tabela 2 mostra a melhor condição de análise obtida para detecção simultânea dos três compostos avaliados. Foi obtida boa separação entre os três ácidos, no entanto, a sensibilidade para ácido oxálico foi baixa, comparada com a dos demais compostos (Figura 1).

A dificuldade de detecção de ácido oxálico por MS foi apontada anteriormente por alguns autores (Moldoveanu et al., 2018), enquanto que a detecção de outros ácidos alifáticos como ácido succínico por MS, utilizando colunas HILIC, tem sido mais comumente empregada (Teleki; Takors, 2019; Huang et al., 2012).

**Tabela 2.** Condições cromatográficas otimizadas para o método utilizando a coluna HSS T3.

Tempo (min)	Vazão (mL/min)	Eluente A: H <sub>2</sub> O + AF 0,1% (%)	Eluente A: ACN + AF 0,1% (%)
0,00	0,4	100	0
1,00	0,4	100	0
4,00	0,4	70	30
6,00	0,4	0	100
8,00	0,4	0	100
12,00	0,4	100	0



**Figura 1.** Cromatograma obtido por UHPLC-ESI(-)-MS/MS, utilizando o gradiente de eluição mostrado na Tabela 2 e a coluna HSS T3, da solução contendo os padrões analíticos de ácido oxálico a 100 µg/mL ( $m/z$  88,85;  $t_R$ : 0,92), ácido succínico a 50 µg/mL ( $m/z$  117;  $t_R$ : 2,77) e ácido adípico a 50 µg/mL ( $m/z$  144,95;  $t_R$ : 3,76).

## Conclusão

Para o desenvolvimento de um método de análise de ácido adípico, ácido oxálico e ácido succínico por espectrometria de massas UHPLC-MS/MS foram avaliadas três colunas cromatográficas com diversas condições de análise. Foram obtidas boas condições para ácido adípico e ácido succínico com as três colunas investigadas (Zic-HILIC SeQuant, HILIC BEH Amida, HSS T3). O uso coluna HSS T3, no entanto, possibilitou a detecção dos três analitos avaliados, inclusive do ácido oxálico, ainda que com baixa sensibilidade. A metodologia desenvolvida vem sendo aplicada em projeto de codesenvolvimento que avalia a conversão (bio)catalítica de lignina em ácidos dicarboxílicos e, por razões de sigilo industrial, apenas os dados de desenvolvimento (sem aplicação em amostras reais) foram apresentados.

## Referências

- HALDAR, D.; PURKAIT, M. K. Lignocellulosic conversion into value-added products: A review. **Process Biochemistry**, v. 89, p. 110-133, 2020.
- HUANG, Y.; TIAN Y., ZHANG Z., PENG C. A HILIC-MS/MS method for the simultaneous determination of seven organic acids in rat urine as biomarkers of exposure to realgar. **Journal of Chromatography B**, v. 905, p. 37-42, 2012.
- MEI, Q.; SHEN, X.; LIU, H.; HAN, B. Selectively transform lignin into value-added chemicals. **Chinese chemical letters**, v. 30, n. 1, p. 15-24, 2019.
- MOLDOVEANU, S. C.; POOLE, T.; SCOTT, W. A. An LC-MS Method for the Analysis of Some Organic Acids in Tobacco Leaf, Snus, and Wet Snuff. **Beiträge zur Tabakforschung International/Contributions to Tobacco Research**, v. 28, n. 1, p. 30-41, 2018.
- PONNUSAMY, V. K.; NGUYEN, D. D.; DHARMARAJA, J.; SHOBANA, S.; BANU, J. R.; SARATALE, R. G.; KUMAR, G. A review on lignin structure, pretreatments, fermentation reactions and biorefinery potential. **Bioresource technology**, v. 271, p. 462-472, 2019.
- PUTRI, S. P.; FUKUSAKI, E. **Mass spectrometry-based metabolomics: a practical guide**. CRC Press, 2014.
- TELEKI, A.; TAKORS, R. Quantitative Profiling of Endogenous Metabolites Using Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (HILIC-MS/MS). In: **Microbial Metabolomics**. Humana Press, New York, NY, 2019. p. 185-207.
- XIAO, J. F.; ZHOU, B.; RESSOM, H. W. Metabolite identification and quantitation in LC-MS/MS-based metabolomics. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v.32, p.1-14, 2012.